

COPIA OFICIAL  
CONVENIO DE PARIS  
-Lisboa 1958-

9 / 830964

05/97/26241

REPUBLICA



4  
ARGENTINA

0599/26241

**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

*Ministerio de Economía  
y Obras y Servicios Públicos  
Instituto Nacional de la Propiedad Industrial*

## CERTIFICADO DE DEPOSITO

Acta Nº           P98 01 05610          

REC'D 25 JAN 2000

WIPO PCT

El Comisario de la Administración Nacional de Patentes, certifica que con  
fecha   6   de   NOVIEMBRE   de 19   98   se presentó a nombre de   BIO SIDUS    
  S.A. , CON DOMICILIO EN CAPITAL FEDERAL.  

una solicitud de Patente de Invención relativa a "PROCEDIMIENTO PARA LA PURIFICACION  
DE ERITROPOYETINA HUMANA RECOMBINANTE A PARTIR DE SOBRENADANTES DE  
CULTIVO".

cuya descripción y dibujos adjuntos son copia fiel de la documentación depositada en el  
Instituto Nacional de la Propiedad Industrial.

Se certifica que lo anexado a continuación en dieciocho fojas es copia fiel de los registros de  
la Administración Nacional de Patentes de la República Argentina de los documentos de la  
solicitud de Patentes de Invención precedentemente identificada.

A PEDIDO DEL SOLICITANTE Y DE CONFORMIDAD CON LO ESTABLECIDO EN  
LA CONVENCIÓN DE PARIS (LISBOA 1958), APROBADO POR LEY 17.011, EXPIDO LA  
PRESENTE CONSTANCIA DE DEPOSITO EN BUENOS AIRES, REPUBLICA ARGENTINA, a  
los veinticuatro días del mes de JUNIO de 1999.

Ing. GERARDO P. BELLOTTI  
Comisario  
Adm. Nacional de Patentes



# Memoria Descriptiva de la Patente de Invención

Sobre

Procedimiento para la purificación de Eritropoyetina Humana  
Recombinante a partir de sobrenadantes de cultivo.

Solicitada por

**Bio Sidus S.A.**

Por el plazo de 20 años



Constitución 4234 - 1254  
Buenos Aires - Argentina



**LA PRESENTE PATENTE DE INVENCION TIENE POR OBJETO PRINCIPAL UN  
PROCEDIMIENTO PARA LA PURIFICACION DE ERITROPOYETINA HUMANA  
RECOMBINANTE A PARTIR DE SOBRENADANTES DE CULTIVO DE CELULAS**

A pesar que existe gran cantidad de información referida a la producción de Eritropoyetina recombinante humana (EPO), no se ha descrito ningún método que lleve a la purificación de EPO apta para su utilización en humanos, con una pureza mayor al 99 % y con ausencia de contaminantes como: a) material agregado, b) degradados, c) proteínas espúreas y, d) proteasas. Una pureza menor del 99 % o la presencia de cualquiera de los contaminantes mencionados puede ser tóxico para el ser humano.

La mayor parte de los sistemas conocidos llevan a obtener material de calidad suficiente, en el mejor de los casos, para uso *in vitro*, pero no para inyección en humanos.

Adicionalmente, muchos de los métodos publicados son imposibles de reproducir, o de utilizar a escala industrial, o tienen bajísima recuperación o todo ello al mismo tiempo.

**Novedad del invento - objeto principal de la patente**

El novedoso método de la invención describe en detalle un sistema de purificación de EPO con el que se logra una alta recuperación, con gran pureza y calidad del producto obtenido, en modo que éste puede ser utilizado sin posteriores tratamientos de purificación, para formular compuestos farmacéuticos de uso en medicina humana, por ejemplo como inyectables.

El procedimiento de purificación reivindicado en la presente patente de invención, incluye una serie de pasos concatenados (micro y ultrafiltraciones, cromatografías líquidas, precipitaciones, etc.), y que deben rendir una molécula con un alto grado de pureza. Esta



molécula debe estar libre de proteasas y de variantes moleculares no deseadas (agregados, degradados, moléculas de punto isoelectrico diferentes del esperado, etc.).

La invención reivindicada describe un procedimiento para la purificación a escala industrial de EPO apta para uso en humanos.

El procedimiento para la purificación de Eritropoyetina humana recombinante se realiza a partir de sobrenadantes de cultivo de células, y se destaca porque no se utilizan pasos de HPLC.

La EPO obtenida mediante el procedimiento reivindicado tiene más del 99 % de pureza.

El procedimiento se destaca además porque no somete a la EPO a condiciones extremas de temperatura o exposición a solventes orgánicos o inorgánicos que pueden resultar agresivos para la proteína.

El procedimiento conlleva pasos de purificación que incluyen precipitaciones diferenciales, interacción hidrofóbica, intercambio aniónico, intercambio catiónico y exclusión molecular.

La EPO que se obtiene siguiendo el procedimiento de la presente patente de invención puede ser utilizada directamente en formulaciones farmacéuticas para su uso en humanos. La EPO obtenida es una proteína heterogénea conformada por no menos de 5 y no más de 8 isoformas de punto isoelectrico comprendido entre 3,0 y 4,5 y que posee una actividad biológica medida *in vivo* de no menos de 100.000 Unidades Internacionales/mg de proteína.



El procedimiento lleva a obtener EPO libre de material degradado y/o agregados, así como de proteasas.

## **EJEMPLO 1.**

### **Etapas 1. Recuperación (Clarificación)**

En 30 litros de concentrado estéril proveniente de sobrenadantes de cultivo de células productoras de EPO se disuelven 7920 gramos de Sulfato de Amonio y la solución se mantiene a 4 °C durante 24 h. Varias proteínas contaminantes precipitan mientras la EPO permanece en solución. El producto es centrifugado a 5000 RPM, en una centrífuga marca Sorvall, utilizando un rotor HG4L.

### **Etapas 2. Cromatografía de Interacción Hidrofóbica**

El material proveniente del paso anterior es cromatografiado utilizando una matriz de Interacción Hidrofóbica ( Phenyl Sepharose 6 Fast Flow low sub.- Pharmacia) de acuerdo a:

#### **Equipamiento**

##### ***Pre-Columna:***

- Diámetro: 10 cm
- Altura de Lecho: 25 cm
- Matriz:
  - Q-Sepharose Big Bead. (Pharmacia)
  - Volumen : 2000 ml

##### ***Columna:***

- Diámetro: 20 cm



-Altura de Lecho: 13 cm

-Matriz:

-Phenyl-Sepharose 6 Fast Flow low sub. (Pharmacia)

-Volumen: 4000 ml

#### Soluciones y buffers

-Buffer A:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  anh. 10 mM, pH 7.2

-Buffer F:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  anh. 10 mM,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.8 M, pH 7.2

-Buffer G:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  anh. 150 mM, pH 7.2

-Isopropanol 30 %

-NaOH 0.5 N

#### Material a Cromatografiar

*Material:* Sobrenadante de Sulfato de Amonio, proveniente del ejemplo 1.

#### *Condiciones de la Muestra :*

-Volumen: 10.000 ml

-Masa proteica total (Bradford): 20-40 gramos

-Concentración aproximada (Bradford): 2.0-4.0 mg/ml

-Conductividad: 190-210 mSi/cm

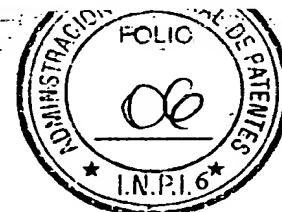
-pH: 7.2

#### Sanitización y Equilibrado de la precolumna (\*)

Para equilibrar la precolumna se procede a pasar por la misma, en forma secuencial las siguientes soluciones o buffers en las cantidades que se detallan a continuación: 1.0 vc (2 litros) de Agua; 1.0 vc (2 litros) de NaOH 0.5N; 1.0 vc (2 litros) de Buffer G y finalmente 1.5 vc (3 litros) de Buffer F,

#### Sanitización y Equilibrado de la columna (\*)

Para equilibrar la columna se procede a pasar por la misma, en forma secuencial las siguientes



soluciones o buffers en las cantidades que se detallan a continuación: 1.0 vc (4 litros) de *Agua*; 1.0 vc (4 litros) de *Isopropanol 30%*; 1.0 vc (4 litros) de *Agua*, 1.0 vc (4 litros) de *NaOH 0.5N*; 1.0 vc (4 litros) de *Agua*; -1.0 vc (4 litros) de *Buffer G* y finalmente 1.5 vc (6 litros) de *Buffer F*

### **Condiciones de corrida**

Una vez equilibradas la precolumna y la columna, se conectan la segunda a continuación de la primera y se procede a sembrar el material a cromatografiar. Dicha siembra se realiza a una temperatura de 4 °C con un flujo de 100 ml/min (24 cm/hora). A continuación se realiza la elución al mismo flujo pero a temperatura ambiente, haciendo pasar las siguientes soluciones y buffers en el orden y cantidades detallados a continuación: 2.5 vc (10 litros) de *Buffer F*, (pasado este buffer se retira la precolumna). Una vez retirada la precolumna la corrida cromatográfica se sigue realizando sobre la columna de Phenyl Sepharose sobre la cual se realiza un gradiente de *Buffer F-Buffer A* partiendo de una proporción 85:15 de dichos buffer hasta llegar a una relación 50:50 de los mismos en un volumen total de 10 vc (40 litros). Terminado el gradiente se pasan 1.5 vc (6 litros) de *Buffer F-Buffer A* en una proporción 30:70 y finalmente 1.5 vc (6 litros) de *Agua*

Las fracciones seleccionadas, conteniendo eritropoyetina son esterilizadas por filtración a través de una membrana con poros de 0,22 µm y se conservan a 4 °C.

(\*) vc significa volumen de columna

### **Etapas 3. Concentración y Diafiltración**

Las fracciones provenientes de la etapa 2 son concentradas y diafiltradas de acuerdo a las condiciones que se detallan a continuación.

### **Equipamiento**

***Bomba peristáltica*** : Watson Marlow - Cat. N° 302S

***Tubuladura*** : Masterflex - Cat. N° 06402-18



**Concentrador :** Prep Scale Millipore CDU F006LC

**Soluciones y buffers**

- Dodecil sulfato de sodio (SDS) 10 mM
- Tritón X-100 1mM
- NaOH 0.1N
- Agua
- Buffer A :  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  anh. 10 mM, pH 7.2

**Material a Procesar**

**Material :** Fracciones seleccionadas provenientes de la etapa 2.

**Condiciones de la Muestra :**

Volumen: 7000-10000 ml

Conductividad: 170-130 mSi/cm

pH: 7.2

**Procedimiento**

En primer lugar se procede a la limpieza, sanitización y equilibración del equipo haciendo pasar por el mismo la siguiente secuencia de soluciones y buffers: 10 litros de *SDS* 10 mM; 40 litros de *Agua*; 10 litros de *Tritón X-100* 1 mM, 40 litros de *Agua*; 10 litros de *NaOH* 0.1N; 40 litros de *Agua* y finalmente 5 litros de *Buffer A*. De esta forma el equipo queda en condiciones de ser utilizado para realizar el proceso de concentración y diafiltración contra *Buffer A* de las fracciones seleccionadas, de acuerdo a la metodología corriente.

**Condición final de concentración**

**Volumen final de concentrado:** 2.000 ml

**Diafiltrado contra:** Buffer A.

**Conductividad:** 1100-1550  $\mu\text{Si/cm}$

**pH:** 7.2





#### **Etap 4. Cromatografía de intercambio aniónico.**

El material proveniente del paso anterior es cromatografiado utilizando una matriz de Intercambio aniónico de acuerdo a:

##### **Equipamiento**

###### ***Columna:***

- Diámetro: 10 cm
- Altura de Lecho: 25 cm
- Matriz
  - Q-Sepharose Fast Flow. (Pharmacia)
- Volumen: 2000 ml

##### **Soluciones y buffers**

- Buffer A:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  anh. 10 mM, pH 7.2
- Buffer G:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  anh. 150 mM, pH 7.2
- Buffer Ñ: Ac. Acético 50 mM,  $\text{ClNa}$  500 mM, pH 4.0
- Buffer S: Ac. Acético 50 mM, pH 4.0
- NaOH 0.5 N

##### **Material a Cromatografiar**

**Material:** Fracciones seleccionadas de Interacción Hidrofóbica, concentradas y diafiltradas.

###### ***Condiciones de la Muestra:***

- Volumen: 2.000 ml
- Masa proteica total (Bradford): 8.0-10 gramos
- Concentración aproximada (Bradford): 4.0-5.0 mg/ml
- Conductividad: 1100-1550  $\mu\text{Si/cm}$
- pH : 7.2



### Sanitización y Equilibrado de la columna (\*)

Para equilibrar la columna se procede a pasar por la misma, en forma secuencial las siguientes soluciones o buffers en las cantidades que se detallan a continuación: 1.0 vc (2 litros) de *Agua*; 1.0 vc (2 litros) de *NaOH 0.5N*; 1.0 vc (2 litros) de *buffer Ñ*; 2.0 vc (4 litros) de *Buffer S*; 3.0 vc (6 litros) de *Buffer G*; y finalmente 2.0 vc (4 litros) de *Buffer A*

### Condiciones de corrida (\*)

Una vez equilibrada la columna se procede a sembrar el material a cromatografiar. Dicha siembra se realiza a temperatura ambiente a un flujo de 100 ml/min (76 cm/hora). A continuación se realiza la elución al mismo flujo y temperatura, haciendo pasar las siguientes soluciones y buffers en el orden y cantidades detallados a continuación: 1.0 vc (2 litros) de *Buffer A* y 4.0 vc (8 litros) de *Buffer S*. A continuación se realiza un gradiente de *Buffer S-Buffer Ñ* partiendo de una proporción 100:0 de dichos buffer hasta llegar a una relación 50:50 de los mismos en un volumen total de 1.5 vc (3 litros). Terminado el gradiente se pasan 1.5 vc (3 litros) de *Buffer Ñ*. Las fracciones seleccionadas, conteniendo eritropoyetina son esterilizadas por filtración a través de una membrana con poros de 0,22  $\mu\text{m}$  y se conservan a 4 °C.

(\*) vc significa volumen de columna

### **Etapas 5. Cromatografía de intercambio catiónico.**

El material proveniente de la etapa 4 es cromatografiado utilizando una matriz de Intercambio catiónico de acuerdo a:

#### Equipamiento

##### *Columna:*

- Diámetro: 10 cm
- Altura de Lecho: 25 cm
- Matriz:



-SP-Sepharose Fast Flow. (Pharmacia)

-Volumen : 2000 ml

#### Soluciones y buffers

-Buffer D:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  12.5 mM, Ac. Cítrico. $\text{H}_2\text{O}$  4 mM, pH 6.0

-Buffer E:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  12.5 mM, Ac. Cítrico. $\text{H}_2\text{O}$  4 mM,  $\text{ClNa}$  0.5M, pH 6.0

-NaOH 0.5 N

#### Material a Cromatografiar

**Material:** Fracción seleccionada en la etapa 4 ajustada a pH 6.0 con NaOH cc. y diluida hasta conductividad 4800  $\mu\text{S}/\text{cm}$  (conductividad igual a Buffer D-Buffer E 93.5:6.5)

#### Condiciones de la Muestra:

-Volumen: 5.000 ml

-Masa proteica total (Bradford): 4.5-5.5 gramos

-Concentración aproximada (Bradford): 0.9-1.1 mg/ml

-Conductividad : 4800  $\mu\text{S}/\text{cm}$  (Igual a Buffer D-Buffer E en un apropiación 93.5:6.5)

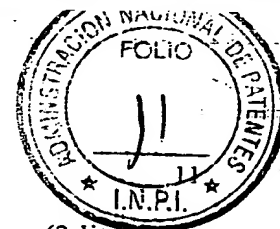
-pH: 6.0

#### Sanitización y Equilibrado de la columna (\*)

Para equilibrar la columna se procede a pasar por la misma, en forma secuencial las siguientes soluciones o buffers en las cantidades que se detallan a continuación: 1.0 vc (2 litros) de *Agua*; 1.0 vc (2 litros) de *NaOH 0.5N*; 1.0 vc (2 litros) de *Buffer E* y finalmente 1.5 vc (3 litros) de *Buffer D-Buffer E* en una proporción 93.5:6.5

#### Condiciones de corrida (\*)

Una vez equilibrada la columna se procede a sembrar el material a cromatografiar. Dicha siembra se realiza a temperatura ambiente a un flujo de 100 ml/min (76 cm/hora). A continuación se realiza la elución al mismo flujo y temperatura, haciendo pasar las siguientes



soluciones y buffers en el orden y cantidades detallados a continuación: 1.5 vc (3 litros) de *Buffer D-Buffer E* en un aporporción 93.5:6.5. A continuación se realiza un gradiente de *Buffer D-Buffer E* partiendo de una proporción 93.5:6.5 de dichos buffer hasta llegar a una relación 50:50 de los mismos en un volumen total de 2.0 vc (4 litros). Terminado el gradiente se pasan 1.5 vc (3 litros) de *Buffer E*. Las fracciones seleccionadas, conteniendo eritropoyetina son esterilizadas por filtración a través de una membrana con poros de 0,22  $\mu\text{m}$  y se conservan a 4 °C.

(\*) vc significa volumen de columna

#### **Etapas 6. Concentración y Diafiltración**

Las fracciones provenientes del paso anterior son concentradas y diafiltradas de acuerdo al procedimiento que sigue.

#### **Equipamiento**

*Bomba peristáltica:* Watson Marlow - Cat. N° 302S

*Tubuladura:* Masterflex - Cat. N° 06402-18

*Concentrador:* Prep Scale Millipore CDU F002LC

#### **Soluciones y buffers**

-Dodecil sulfato de sodio (SDS) 10 mM

-Tritón X-100 1mM

-NaOH 0.1N

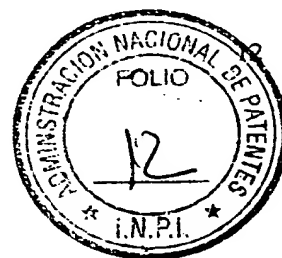
-Agua

-Buffer B :  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  anh. 10 mM,  $\text{ClNa}$  0.5 M, Lactosa 0.05 mg/ml, pH 7.2

#### **Material a Procesar**

*Material:* Fracciones seleccionadas en la etapa 5.

*Condiciones de la Muestra:*



-Volumen: 8000 ml

-Masa proteica total (Bradford): 3.5-4.5 gramos

-Concentración aproximada (Bradford): 0.4-0.6 mg/ml

-Conductividad: 5000-8000  $\mu\text{Si/cm}$

-pH: 6.0

### Procedimiento

En primer lugar se procede a la limpieza, sanitización y equilibración del equipo haciendo pasar por el mismo la siguiente secuencia de soluciones y buffers: 10 litros de *SDS* 10 mM; 40 litros de *Agua*; 10 litros de *Tritón X-100* 1 mM, 40 litros de *Agua*; 10 litros de *NaOH* 0.1N; 40 litros de *Agua* y finalmente 5 litros de *Buffer B*. De esta forma el equipo queda en condiciones de ser utilizado para realizar el proceso de concentración y diafiltración contra *Buffer B* de las fracciones seleccionadas, de acuerdo a la metodología corriente.

### Condición final de concentración

*Volumen final de concentrado:* 400 ml

*Diafiltrado contra:* Buffer B.

*Conductividad:* 15500-19000  $\mu\text{Si/cm}$

*pH:* 7.2

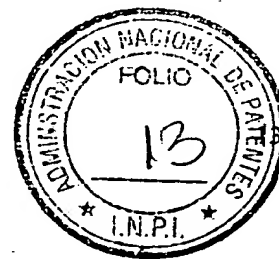
*Conservación:* a 4°C.

### **Etapas 7. Cromatografía de exclusión molecular**

El material proveniente del paso anterior es cromatografiado utilizando una matriz de exclusión molecular de acuerdo a:

### Equipamiento

*Columna:*



-Diámetro: 10 cm

-Altura de Lecho: 76 cm

**Matriz:**

-Sephacryl S-200 HP (Pharmacia)

-Volumen: 6000 ml

**Soluciones y buffers**

-Buffer B:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  anh. 10 mM,  $\text{ClNa}$  0.15 M, Lactosa 0.05 mg/ml, pH 7.2

-NaOH 0.5 N

**Material a Cromatografiar**

**Material:** Fracciones seleccionadas en la etapa 6 concentradas.

***Condiciones de la Muestra:***

-Volumen: 400 ml

-Masa proteica total (Bradford): 3.5-4.5 gramos

-Concentración aproximada (Bradford): 8.5-11 mg/ml

-Conductividad: 15500-19000  $\mu\text{Si}/\text{cm}$

-pH: 7.2

**Sanitización y Equilibrado de la columna (\*)**

Para equilibrar la columna se procede a pasar por la misma, en forma secuencial las siguientes soluciones o buffers en las cantidades que se detallan a continuación: 1.0 vc (6 litros) de *Agua*; 1.5 vc (9 litros) de *NaOH 0.5N* y finalmente 3.0 vc (18 litros) de *Buffer B*.

**Condiciones de corrida (\*)**

Una vez equilibrada la columna se procede a sembrar 100 ml del material a cromatografiar. Dicha siembra se realiza a temperatura ambiente a un flujo de 35 ml/min (27 cm/hora). A continuación se realiza la elución al mismo flujo y temperatura, haciendo pasar 0.75 vc (4.5



litros) de *Buffer B*. Este procedimiento se repite 4 veces, es decir, hasta finalizar el material a cromatografiar. Las fracciones seleccionadas, conteniendo eritropoyetina son esterilizadas por filtración a través de una membrana con poros de  $0,22 \mu\text{m}$  y se conservan a  $4^\circ\text{C}$ .

(\*) vc significa volumen de columna

nifica volumen de columna.

En este paso concluye el proceso de purificación obteniéndose eritropoyetina humana recombinante con un grado de pureza superior al 99 % y con rendimiento global del proceso aproximado al 30 %.

La EPO obtenida en el presente ejemplo fue sometida a diferentes estudios identificatorios y que prueban su calidad.

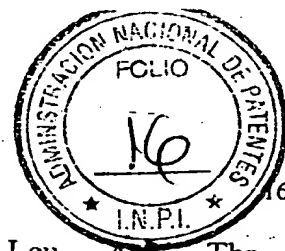
1. En un gel desnaturizante SDS-PAGE corrió como una banda ancha de más de 30 kDa de peso molecular.
2. Esa banda fue reconocida por un anticuerpo monoclonal así como por un anticuerpo policlonal contra Epo humana en un ensayo "Western blot".
3. El tratamiento con glicanasas probó la existencia de las cadenas glicosídicas en cantidad y peso molecular acorde a lo esperado.
4. La EPO producida mostró estar compuesta por una serie de especies de punto isoelectrico comprendido entre 3,0 y 4,5
5. La secuenciación completa de aminoácidos de la proteína aislada y purificada a



partir del sobrenadante de cultivo de las líneas celulares transfectadas ~~modificadas~~ <sup>modificadas</sup> con  
homología con la eritropoyetina humana natural que posee la siguiente secuencia de  
165 aminoácidos.

NH <sub>2</sub> —	Ala	Pro	Pro	Arg	Leu	Ile	Cys	Asp	Ser	Arg	Val	Leu
	Glu	Arg	Tyr	Leu	Leu	Glu	Ala	Lys	Glu	Ala	Glu	<u>Asn</u>
	Ile	Thr	Thr	Gly	Cys	Ala	Glu	Hys	Cys	Ser	Leu	Asn
	Glu	<u>Asn</u>	Ile	Thr	Val	Pro	Asp	Thr	Lys	Val	Asn	Phe
	Tyr	Ala	Trp	Lys	Arg	Met	Glu	Val	Gly	Gln	Gln	Ala
	Val	Glu	Val	Trp	Gln	Gly	Leu	Ala	Leu	Leu	Ser	Glu
	Ala	Val	Leu	Arg	Gly	Gln	Ala	Leu	Leu	Val	<u>Asn</u>	Ser
	Ser	Gln	Pro	Trp	Glu	Pro	Leu	Gln	Leu	Hys	Val	Asp
	Lys	Ala	Val	Ser	Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Thr	Leu
	Leu	Arg	Ala	Leu	Gly	Ala	Gln	Lys	Glu	Ala	Ile	Ser





Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr

Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val

Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr

Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp—COOH

X sitios de glicosilación

6. La presencia de los cuatro sitios de glicosilación sobre la cadena de 165 aminoácidos así como la estructura compleja de hidratos de carbono, fundamentalmente los residuos de ácido siálico terminales, fueron demostrados conjuntamente con su correcta actividad biológica *in vivo*, en el modelo de ensayo del ratón policitémico ex-hipóxico, exhibiendo total paralelismo frente al estándar internacional correspondiente.



## REIVINDICACIONES

Habiendo descripto y ejemplificado la naturaleza y objeto principal de la presente invención, así como también la manera en que la misma se puede llevar a la práctica, se declara reivindicar como de propiedad y de derechos exclusivos:

1.- UN PROCEDIMIENTO PARA LA PURIFICACIÓN DE ERITROPOYETINA HUMANA RECOMBINANTE A PARTIR DE SOBRENADANTES DE CULTIVO DE CÉLULAS caracterizado por incluir la siguiente sucesión de etapas:

- 1.- Realizar una recuperación de EPO mediante una precipitación diferencial.
- 2.- Realizar una cromatografía por interacción hidrofóbica.
- 3.- Acondicionar el material mediante concentración y diafiltración.
- 4.- Realizar una cromatografía por intercambio aniónico.
- 5.- Realizar una cromatografía por intercambio catiónico.
- 6.- Acondicionar el material mediante concentración y diafiltración.
- 7.- Realizar una cromatografía de exclusión molecular.

ERITROPOYETINA/2.- ERITROPOYETINA obtenida por el procedimiento indicado en 1, caracterizado porque la EPO obtenida tiene más del 99% de pureza.

BIO SIDUS S.A.  
HUBERTO M. DE PASQUALE  
APODERADO

BIO SIDUS S.A.  
HUBERTO M. DE PASQUALE  
APODERADO



## RESUMEN

La presente invención se refiere a un método altamente eficiente, caracterizado por su reproducibilidad, alto rendimiento y susceptibilidad de aplicación industrial para la obtención de EPO.

El procedimiento incluye una secuencia específicamente diseñada que incluye precipitación diferencial, cromatografía líquida de interacción hidrofóbica, intercambio aniónico, intercambio catiónico y de exclusión molecular.

Se brinda información analítica que avala la calidad de la EPO obtenida.

La EPO de altísima pureza queda finalmente en un buffer de composición definida, lo que permite su posterior formulación farmacéutica.



5  
5  
7  
4

5  
5  
7  
4